

· 巴西草药研究专题 ·

基于 DNA 条形码—产地—形态分析联用的巴西草药 *DENTE DE LEÃO* (蒲公英) 的混伪品鉴定及生药学研究

顾选 崔秀梅 余春霞 马长华 肖瑶 韩丽 刘春生 赵百孝 哈略

【摘要】 目的 对巴西市场上销售的药用蒲公英的混伪品进行鉴定及生药学研究。**方法** 通过提取样品 DNA、PCR 扩增及双向测序,获得样品的 ITS 序列。采用相似度分析法进行分子鉴定;根据植物产地分布特征和形态特征验证结果,三种方法联用获得鉴定结果;分析混伪品的性状和显微特征。**结果** DNA 条形码研究表明巴西药用蒲公英的混伪品来源于菊科植物假蒲公英猫儿菊 *Hypochaeris radicata* 的全草,产地分析和形态分析验证了 DNA 条形码鉴定结果。**结论** 巴西药用蒲公英的混伪品来源于菊科蒲公英属植物假蒲公英猫儿菊 *Hypochaeris radicata* 的全草。混伪品的生药学特征能够为巴西草药 DENTE DE LEÃO 的真伪鉴别提供依据。

【关键词】 巴西草药; 药用蒲公英; 混伪品; DNA 条形码; 鉴定

【中图分类号】 R284 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.11.004

The pharmacognosy research on the adulterants of Brazilian herb *DENTE DE LEÃO* based on a combined analysis of DNA barcoding-origin-morphology GU Xuan, CUI Xiu-mei, YU Chun-xia, et al. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China
Corresponding author: LIU Chun-sheng, E-mail: max_liucs@263.net

【Abstract】 Objective To study a new adulterant of *DENTE DE LEÃO* in Brazil and perform a pharmaceutical analysis. **Methods** Total genomic DNA was isolated from the materials, and nuclear DNA ITS sequences were amplified and sequenced. Similarity identification of BLAST analysis was performed. Next, the results were verified according to plant geographical distribution and morphological profiles. Finally, the features of adulterant were demonstrated through microscopic observation. **Results** Adulterants of Brazil herbs *DENTE DE LEÃO* was *Hypochaeris radicata* Linnaeus, Sp. Pl. The origin analysis and morphological analysis verified the results of DNA barcoding. **Conclusion** Adulterants of Brazilian herb *DENTE DE LEÃO* are from the Asteraceae plant *Hypochaeris radicata* with the whole plants. Adulterants pharmacognosy features can provide the basis for identification of Brazil herbs *DENTE DE LEÃO*.

【Key words】 Brazilian herb; *DENTE DE LEÃO*; Adulterants; DNA barcoding; Identification

基金项目: 国家国际科技合作专项(2011DFA31370)

作者单位: 100102 北京中医药大学中药学院(刘春生、马长华), 针灸推拿学院[赵百孝、哈略(硕士研究生)], 中医养生学研究所(韩丽); 北京华邈中药工程技术开发中心(顾选、崔秀梅); 河南省药品审评认证中心(余春霞)

作者简介: 顾选(1990-), 女, 硕士。研究方向: 药用植物与分子生药学。E-mail: guxuan123.love@163.com

通讯作者: 刘春生(1964-), 博士, 教授, 博士生导师。研究方向: 药用植物与分子生药学。E-mail: max_liucs@263.net

草药 *DENTE DE LEÃO* 是巴西民族的常用药, 常作为助消化与利水通淋类药物^[1]。笔者在走访巴西药材市场时发现, *DENTE DE LEÃO* 被人们当做药用蒲公英 *Taraxacum officinale* 出售及使用, 有研究亦认为 *DENTE DE LEÃO* 的来源为药用蒲公英。但是笔者发现, 市场上收集的草药 *DENTE DE LEÃO* 与药用蒲公英植物的性状描述有差异。为保证巴西药用蒲公英临床使用的准确性和安全性, 有必要

对巴西药用蒲公英的混伪品进行品种鉴定研究,为其质量控制提供依据。

性状鉴定方法具有简单、经济的优点,但其依赖于鉴定者的经验和文献资料,主观性较强^[2],显微特征往往难以解决属以下近缘种药材的鉴定难题^[3]。随着分子生物技术的迅速发展,DNA 条形码技术凭借高效、准确、客观、能够鉴别无背景信息的样品的优点^[4-5],广泛应用于中药鉴定^[6-8]。但是,对于原始部落的民族药用植物,同属物种亲缘关系密切,条形码相似度极高,还存在数据库注册物种序列不全面的问题,DNA 条形码鉴定方法不能完全解决民族药鉴定的问题。药用植物通常具有其固定的产地,尤其是野生药用植物,产地信息对药材鉴定有重要作用。植物的部分信息,如叶片形态、花蕾、果实信息等,在科属确定的基础上,对种的鉴别具有重要意义^[9]。基于以上思路,本研究采用“DNA 条形码-产地-形态”联用方法对药材混伪品进行鉴定,该方法能够弥补传统鉴定方法的缺点,为药材鉴别和质量控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2012 年 4 月于巴西隆城市场采购巴西药用蒲公英伪品 3 批,每批 200 g,样品的凭证标本保存于北京中医药大学标本室。

1.2 试剂

广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒(北京博迈德生物有限公司,批号:69632855)、Taq 酶等 PCR 试剂(上海生工生物工程有限公司,批号:695673BE)、乙醇、琼脂糖、ddH₂O 等。

1.3 仪器

SIGMA3K-15 低温高速离心机(SIGMA 公司),TECHNE TC-3000PCR 扩增仪,Bio-Rad 电泳仪,水平电泳槽(北京六一仪器厂),JS-680B 全自动凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司),GRANT 制冰机,超纯水制备系统,KQ5200E 型超声波清洗器,SANYO-80℃ 超低温冰箱(SANYO 公司),DHG-9145A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.4 DNA 提取和 PCR 扩增

方法取样品,观察形态,形态结果一致。取叶片进行 DNA 提取。各份样本分别用液氮冷冻后研磨成细粉,采用植物 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。

采用 ITS 序列通用引物在热循环扩增仪上进行扩增,PCR 扩增条件:50 μL 体系含 2 × Taq PCR MasterMix 25 μL,引物 P1 和 P4 各加 2.5 μL(5 μmol/L),DNA 模板 4 μL,ddH₂O 16 μL。PCR 扩增程序:94℃ 预变性 5 分钟,94℃ 变性 1 分钟,55℃ 退火 1 分钟,72℃ 延伸 1 分钟,40 个循环后,72℃ 延伸 10 分钟^[3]。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下检视,均由上海生工生物工程有限公司测序部测序。各样品均采用正向和反向测序,以保证测序的准确性。

1.5 序列分析方法

利用 ContigExpress 软件对测序获得的正、反向序列进行拼接,根据 ITS 序列边界保守区截取待鉴定物种的 ITS 全长序列,然后利用相似度法分析序列。

1.6 基于 DNA 条形码的鉴定方法

根据 NCBI 中 BLAST 功能,检索 NCBI 中注册的相似度最高的物种,按照相似度最高的物种截取 ITS 全长。再利用样品的 ITS 序列检索,本文以相似度 90%^[11-12]为科属的鉴定阈值,以最高相似度科属为鉴定依据;以相似度 97% 为物种鉴定阈值,认为相似度在 97% 以上可能为相同物种,否则,数据库中可能未收录该序列,以相似度 97% 以上的最高相似度物种为鉴定依据,获得鉴定结果。

1.7 基于产地分析的鉴定方法

根据“1.6”项下获得的物种鉴定结果,依据《巴西植物志》记载该属植物物种信息,如果最高相似度物种与产地分析不符合,分析第二最高相似度物种,直到符合产地分析要求,获得物种的鉴定结果。

1.8 基于形态分析的鉴定方法

根据“1.7”项下获得的鉴定结果,查询《巴西植物志》数据库中巴西草药的形态信息,通过形态核对,进一步证实“1.7”项下的鉴定结果。

1.9 生药学研究及比较

根据颜色、形状、大小等观察混伪品的性状特征,在显微镜下观察显微特征,描述混伪品的性状和显微特征,比较混伪品和药用蒲公英的区别。

2 结果与分析

2.1 基于 DNA 条形码的鉴定

2.1.1 科属的鉴定 3 份样品的测序峰图良好,3 份

样品的测序结果一致,选择一条序列用于后续分析。截取 ITS 片段后,经 BLAST 检索,样品与菊科猫儿菊属 *Hypochaeris* L. 植物相似度最高,相似度范围为 91% ~ 100%,与其他属相似度均低于 91%。因此,该样品来自菊科猫儿菊属植物。

2.1.2 种的鉴定 根据 DNA 条形码鉴定指标(相同物种相似度达到 97% 以上,相似度最高的物种为最佳鉴定结果),样品与假蒲公英猫儿菊 *Hypochaeris radicata* 的相似度最高,相似度为 100%,因此,巴西药用蒲公英伪品的基原为假蒲公英猫儿菊。

2.2 基于产地分析的鉴定

根据文献记载,南美洲国家很早引进假蒲公英猫儿菊物种,巴西 20 世纪已有假蒲公英猫儿菊物种的记载。因此,从产地信息分析,该巴西草药可能为 *Hypochaeris radicata*。

2.3 基于形态分析的鉴定

样品具有主根。叶倒披针形,基部狭窄,边缘波状齿,先端圆形。花具有少数几个头状花序,小花呈明亮的黄色。瘦果棕色,体圆筒状,具有冠毛。与药用蒲公英的主要区别是:药用蒲公英叶片形状具有明显羽状深裂,顶端裂片三角形^[13];而假蒲公英猫儿菊叶片披针形,边缘波状齿,先端圆形。根据以上特征,本品与 www.efloras.org 数据库中收录的假蒲公英猫儿菊的形态特征基本符合,因此,根据形态分析,本品来源于菊科假蒲公英猫儿菊的全草。

2.4 混伪品的生药学研究

2.4.1 性状特征 混伪品根头部倒圆锥形,基生,花梗一至数个。叶多皱缩破碎,灰绿色或绿褐色,富黄白色柔毛,先端钝或尖,叶基部渐狭,下延成柄状,浅裂。花倒圆锥形,有时稍压扁呈扇形。头状花序,总苞片多层,外层为舌状花,管状花多数,位于中央,黄色。花梗较长,灰绿色,中空,光滑,直径 0.2 ~ 0.7 cm,折断面纤维性,外层灰绿色,内层黄白色,内层质松软,有弹性。果椭圆形,具白色冠状毛,由花托处放射状长出瘦果。混伪品与药用蒲公英在叶片形状上存在较大的区别:药用蒲公英叶片形状具有明显羽状深裂,顶端裂片三角形;而假蒲公英猫儿菊叶片披针形,边缘波状齿,先端圆形。

2.4.2 显微特征 粉末棕黄色。(1)导管常见具缘纹孔导管,少见螺旋导管或双螺纹导管。(2)花粉粒类球形,外壁有刺。(3)菊糖结晶,不规则形。

(4)石细胞淡黄棕色,类方形,类长方形,类圆形或不规则形,有的层纹明显,壁较厚。



图 1 巴西药用蒲公英混伪品的性状图

3 讨论

传统的鉴定方法依靠文献和鉴定人员的经验,不能鉴别无背景信息的药材,DNA 条形码技术能够弥补传统鉴定方法的不足,通过分子鉴定技术能够对无背景信息药材鉴定,不受样品开花季节及样品外形的影响。有时相似度最高的序列有多个物种,这时利用分子鉴定技术进行药材鉴定也存在困难;采用产地分析和形态分析能够较好的验证 DNA 条形码鉴定方法的鉴定结果,得到准确的鉴定结果。采用 DNA 条形码-产地-形态联合分析,能够快速、准确地对未知样品进行鉴定。通过生药学研究发现,性状特征能够为巴西草药的质量控制提供依据。



1. 导管;2. 花粉粒;3. 菊糖;4. 石细胞

图 2 巴西药用蒲公英混伪品的显微特征图

假蒲公英猫儿菊原产于非洲北部和欧洲,而后,非洲南部和亚洲东南部、澳洲印度北部、日本、北美、南美以及太平洋群岛引进该物种。在 1974 年中国发现该物种,最早见于《台湾植物志》。由于花色鲜艳,可用于盆栽或切花^[14]。假蒲公英猫儿菊与药用蒲公英在形态特征上较为相似,易导致经验不足的人误采误收,给临床上的准确用药带来潜在的

威胁。因此,采药和用药人员应注意观察药用蒲公英的叶片特征来鉴别物种,保证准确用药。

参 考 文 献

- [1] 修锐,金华. 药蒲公英的药理作用[J]. 国外医药·植物药分册,2008,23(1):11.
- [2] 季峰. 浅谈中药的性状鉴定[J]. 国医论坛,2006,21(6):48.
- [3] 杜晔. 诠释中药鉴定四大鉴定方法[J]. 中国医药科学,2012,2(5):101-102.
- [4] 黄璐琦,肖培根,郭兰萍,等. 分子生药学:一门新兴的边缘学科[J]. 中国科学 C 辑:生命科学,2009,(39):1101-1110.
- [5] Xin T Y, Yao H, Gao H H, et. Super food Lycium barbarum (Solanaceae) traceability via an internal transcribed spacer 2 barcode [J]. Food Research International, 2013, 54(2):1699.
- [6] 许亮,刘春生,杨燕云,等. DNA 条形码技术鉴定一种植物样品的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(7):217-219.
- [7] 叶子,卢叶,王峥涛,等. 基于 ITS 序列鉴别石斛类药材[J]. 中国中药杂志,2014,39(20):3930-3935.
- [8] 陈士林,姚辉,韩建萍. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则[J]. 中国中药杂志,2013,38(2):141.
- [9] 顾选,张晓芹,宋晓娜,等. 基于 DNA 条形码-产地-形态联用的药材鉴定新方法研究-以黑果枸杞一种伪品为例[J]. 中国中药杂志,2014,39(24):4759.
- [10] 程小丽,廖彩丽,刘春生,等. 基于 NCBI 核酸数据库的紫荆皮混淆品种华中五味子的 DNA 鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(17):2534.
- [11] 屈良鹄,陈月琴. 生物分子分类检索表——原理与方法[J]. 中山大学学报:自然科学版,1999,38(1):11.
- [12] Landeweert R, Leeftang P, Kuyper T W, et al. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(1):327.
- [13] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京:北京科技卫生出版社,1995,2(2):1.
- [14] 叶喜阳,李根有,马丹丹,等. 浙江省逸生分布新纪录植物——欧洲猫儿菊[J]. 浙江林学院学报,2007,24(5):647.

(收稿日期:2015-08-22)

(本文编辑:董历华)